



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 16 775 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/49
C 12 Q 1/56

⑳ Aktenzeichen: 100 16 775.6
㉑ Anmeldetag: 4. 4. 2000
㉒ Offenlegungstag: 23. 8. 2001

DE 100 16 775 A 1

⑤⑥ Innere Priorität:

100 07 910. 5 21. 02. 2000

⑤⑦ Anmelder:

Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:

Unkrig, Volker, Dr., 68526 Ladenburg, DE;
Marquant, Michael, 68309 Mannheim, DE;
Hindelang, Fritz, Dr., 67316 Carlsberg, DE; Kotzan,
Holger, Dr., 68526 Ladenburg, DE; Horn, Carina, Dr.,
64665 Alsbach-Hähnlein, DE; Nortmeyer, Christine,
68305 Mannheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Elektrochemischer Sensor zur Bestimmung der Blutgerinnung, ein entsprechendes Blutgerinnungsmeßsystem sowie ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen elektrochemischen Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung, der auf einem inerten Träger mindestens 2 Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagens, dadurch gekennzeichnet, daß das Reagens ein Thrombinsubstrat enthält, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin abgespalten werden kann, und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist sowie ein Blutgerinnungsmeßsystem, enthaltend einen solchen Sensor und ein Strommeßgerät, ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mit erfindungsgemäßem Sensor und ein Reagens zur Bestimmung der Blutgerinnung, enthaltend ein Thrombinsubstrat, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin abgespalten werden kann und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß es auch eine Dye-Oxidoreductase, wie beispielsweise Glucose-Dye-Oxidoreductase enthält.

DE 100 16 775 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung, der auf einem inerten Träger mindestens 2 Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagens. Außerdem betrifft die Erfindung ein Blutgerinnungsmeßsystem enthaltend einen elektrochemischen Sensor und ein Strommeßgerät. Schließlich betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mittels eines elektrochemischen Sensors.

In EP-B 0 441 222 werden ein Verfahren und Sensorelektrodensystem zur elektrochemischen Bestimmung eines Analyts oder einer Oxidoreductase beschrieben. Die Patentschrift offenbart die Rolle einer reduzierbaren Substanz als Elektronenüberträger bei der Redoxreaktion eines zu bestimmenden Analyts auf eine Elektrode. Ein typischer Analyt ist Glucose, Lactat oder Redoxenzym, wie beispielsweise Glucose-Dehydrogenase oder Lactat-Dehydrogenase.

Ein elektrochemisches Verfahren zur Bestimmung von Proteasen und Antiproteasen ist aus EP-B 0 018 002 bekannt. Es wird dort ein Proteasen- oder Antiproteasensubstrat aus einem Oligopeptid, an das ein aromatisches oder heterocyclisches Amin oder Polyamin gebunden ist, eingesetzt. Das zu bestimmende Enzym spaltet die Bindung zwischen der carboxyterminalen Aminosäure und dem Amin oder Polyamin und die Menge des freigesetzten Amins oder Polyamins wird elektrochemisch bestimmt. Zwar wird hier die Bestimmung von frei beweglichen Bestandteilen der Blutgerinnungskaskade in Lösung beschrieben, nicht aber die Bestimmung der Blutgerinnung selbst. Hierfür gibt es bislang keine einfache und schnell durchzuführende Bestimmungsmöglichkeit.

Die vorliegende Erfindung stellt zur Lösung dieses Problems einen elektrochemischen Sensor, ein Blutgerinnungsmeßsystem und ein Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung zur Verfügung, wie sie in den Patentansprüchen beschrieben sind.

Der erfindungsgemäße Sensor ist ein Analyseelement auf trockenchemischer Basis und enthält keine klassische Referenzelektrode, wie beispielsweise Ag/AgCl. Das trockene Reagens auf den zwei gleichen Elektroden, vorzugsweise 2 Pd-Elektroden, enthält



als Thrombinsubstrat.

Arg steht für Arginin, Pro für Prolin und Gly für Glycin.

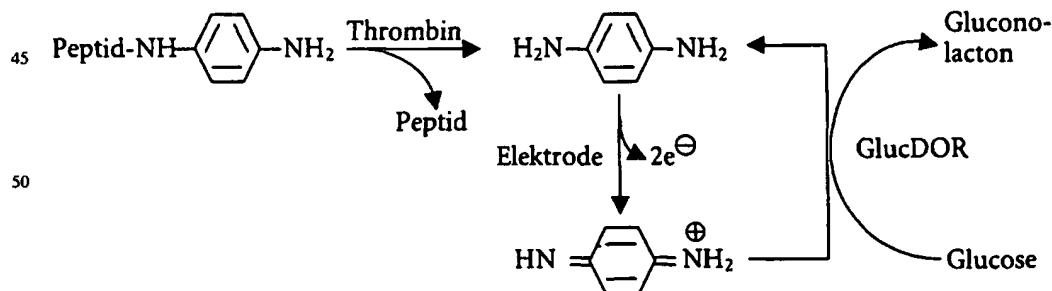
Tos entspricht der Aminoschutzgruppe Tosyl. Als Peptidrest des erfindungsgemäßen Thrombinsubstrats sind alle Reste möglich, die von Thrombin abgespalten werden.

Thrombin ist die letzte Protease der Gerinnungskaskade. Deshalb ist es möglich, die Verklumpung des Blutes durch Messung der Enzymaktivität des Thrombins zu verfolgen.

Bei der Spaltung des Thrombinsubstrats entsteht ein p-Aminoanilin, das an der Arbeitselektrode des Sensors oxidiert wird, wie es in EP-B 0 441 222 beschrieben ist. Die frei werdenden Elektronen werden detektiert. Grundsätzlich sind als elektrochemisch detektierbarer Teil des erfindungsgemäßen Thrombinsubstrats alle die Verbindungen einsetzbar, die als Elektronenüberträger (oder Mediator) 2. Art in EP-B 0 441 222 beschrieben sind.

Besonders vorteilhaft hat es sich bei der vorliegenden Erfindung herausgestellt als Verstärkersystem dem Reagens Glucose-dye-oxidoreductase (GlucDOR) zuzusetzen, welches im zu untersuchenden Blut vorkommende Glucose oxidiert und hierzu den durch die Thrombinaktivität freigesetzten Elektronenüberträger 2. Art als Elektronenakzeptor benutzt.

Die Reaktionen finden nach folgendem Prinzip statt:



Das primäre Oxidationsprodukt des Elektronenüberträgers 2. Art ist ein Chinondiamin, welches mittels einer Dye-Oxidoreductase, wie beispielsweise Glucose-Dye-Oxidoreductase (GlucDOR) in p-Aminoanilin rückgeführt werden kann und damit erneut Elektronen an der Arbeitselektrode abgibt. Somit ist eine beträchtliche Verstärkung des ursprünglichen Signals möglich.

Die elektrochemische Bestimmung der Blutgerinnung erfolgt quasi-potentiostatisch bevorzugt als 2-Elektrodensystem, bei dem die eine Elektrode gleichzeitig als Referenz- und Gegenelektrode, die andere Elektrode als Arbeitselektrode geschaltet ist. An dieses 2-Elektrodensystem wird eine konstante Spannung angelegt und der Strom über die Zeit gemessen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

DE 100 16 775 A 1

Beispiel 1

Fertigung eines Gerinnungssensors für einen PT-Test

I. Beschreibung der elektrochemischen Funktion

a) Offenes Zwei-Elektroden-System für "top-dosing" Probenaufnahme. Ebener Aufbau mit 2 Pd-Elektroden. Auf eine Pd-Elektrode wird eine Ag/AgCl-Paste (Typ: Acheson Electrodag 6037 SS) vollflächig dispensiert, so daß die gesamte Fläche dieser Pd-Elektrode von Ag/AgCl bedeckt ist. Der elektrochemische Betrieb erfolgt quasi-potentiostatisch als 2-Elektroden-System, bei dem die Ag/AgCl Elektrode gleichzeitig als Referenz- und Gegenelektrode, die Pd-Elektrode als Arbeitselektrode geschaltet ist. An diese Zwei-Elektroden-System wird eine konstante Spannung angelegt und der Strom über der Zeit gemessen. b) Ersatz der Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode durch eine lösliche an der Gegenelektrode reduzierbare Substanz ("Mediator 2. Art"):

Es wird eine lösliche reduzierbare Substanz eingesetzt, die an der Gegenelektrode Elektronen aufnimmt und damit den Stromtransport durch die Gegenelektrode gewährleistet. Gleichzeitig wird durch das Reduktionspotential dieser Substanz und durch die an den Sensor zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode angelegte konstante Spannung das an der Arbeitselektrode erreichbare Oxidationspotential begrenzt. Das an der Arbeitselektrode durch Oxidation nachzuweisende p-Aminoanilin muß innerhalb des erreichbaren Oxidationspotentials liegen. Das Potential an der Arbeitselektrode gegen eine hypothetische Silber-Silberchlorid-Bezugselektrode muß sich im beschriebenen Zweielektroden-System so einstellen, daß der Strom durch die Arbeitselektrode (hier Anode) und der Strom durch die Gegenelektrode (hier Kathode) dem Betrag nach gleich sind. Die eingesetzte reduzierbare Substanz darf nicht gleichzeitig an der Arbeitselektrode innerhalb des maximal erreichbaren Oxidationspotentials oxidierbar sein, da sonst das Signal des durch die vorgelagerte enzymatische Reaktion abgespaltene p-Aminoanilin überlagert wird.

II. Herstellung eines trockenchemischen Format für einen PT Test

a) Rezeptur der Dispersion

Rezeptur 1

Ag/AgCl-Elektrodenausführung wie unter Ia) beschrieben

Konzentration Im Beispiel (in Klammern zu beanspruchender Konzentrationsbereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591	Mikrokristalline Zellulose carboxyliert als „Filmbildner“	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,1µg/ml (0,01-2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago

DE 100 16 775 A 1

Rezeptur 2

für den Einsatz des Mediators 2. Art gemäß Ib)

5	Konzentration Im Beispiel (in Klammern zu beanspruchender Konzentrationsbereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
10	0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591	Mikrokristalline Zellulose carboxyliert als „Filmbildner“	FMC-Corporation
15	2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
20	0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
25	0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
30	200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
35	0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
40	0,1µg/ml (0,01-2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
	50 mM (1 – 250 mM)	p-Nitroso-Bis- Hydroxyethyl-anilin	Mediator 2. Art	Roche

b) Dispergierung und Trocknung

45 Von dieser Suspension werden 5 µl auf dem unter 1. beschriebenen Sensor dispergiert und auf einem Bandtrockner oder im Trockenschrank bei 30 bis 50°C getrocknet.

Bei Verwendung eines Sensors zur Bestimmung der Blutgerinnung wird eine Funktionskurve (Strom über Zeit), wie in Fig. 1 gezeigt, erhalten.

50

55

60

65

DE 100 16 775 A 1

Beispiel 2

Herstellung eines trockenchemischen Formats für einen ACT Test

Rezeptur 1

Konzentration Im Beispiel (in Klammern zu beanspruchender Konzentrationsbereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591	Mikrokristalline Zellulose carboxyliert als „Filmbildner“	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
0,5%	Celite	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Sigma

DE 100 16 775 A 1

Rezeptur 2

5	Konzentration Im Beispiel	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
	30 mg/ml	Succrose	Stabilisator	Sigma
10	10 mg/g	Gelatine	Filmbildner	American Gelatin
	0,1 mg/ml	Triton X 100	Detergenz	Sigma
	40 mg/ml	Glycin	Puffer	Roche
15	1%	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche
20	0,1 µg/ml	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
25	3 mg/ml	Bovine Sulfatide	Aktivator des intrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Sigma
30				

Beispiel 3

Amplifikation des Meßsignals

Aus dem Thrombinsubstrat wird durch Einwirkung der Gerinnungskaskade ein p-Aminoanilin (Phenylendiamin) freigesetzt. Dieses wird an der Arbeitselektrode oxidiert und die dabei freiwerdenden Elektroden detektiert. Das primäre Oxidationsprodukt ist dabei ein Chinondiamin. Durch enzymatische Rückführung dieses Oxidationsprodukts in das Phenylendiamin durch eine Dye-Oxidoreduktase z. B. Glucose-Dye-Oxidoreduktase (GlucDOR) ist die erneute Oxidation an der Elektrode und damit eine Verstärkung des ursprünglichen Signals möglich.

Rezeptur

Konzentration Im Beispiel (in Klammern zu beanspruchender Konzentrationsbereich)	Substanz	Funktion der Substanz	Lieferant
0,6% (0,1-5%)	Avicel RC 591	Microkristalline Zellulose carboxyliert als „Filmbildner“	FMC-Corporation
2% (0 – 5%)	Natrosol 250 M	Verdicker	Aqualon
0,05% (0-5%)	Polyox 750	Filmbildner	Union Carbide
0,9% (0,05 – 5%)	Triton X 100	Detergenz	Sigma
200 mM (10 – 500 mM)	HEPES	Puffer	Roche
0,1% (0,01-1%)	RSA (Rinderserumalbumin)	Stützprotein	Roche Diagnostics
0,1µg/ml (0,01- 2µg/ml)	rhTF (human recombinant Tissue factor)	Aktivator des extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung	Stago
1,2 KU/g (0,01-10 KU/g)	Glucose-Dye- Oxidoreductase (GlucDOR)	Enzym	Roche

Die für das "Amplifikationsenzym" als Substrat notwendige Glucose ist Bestandteil der Probe (ca. 10 mM) und wird deshalb nicht in die Rezeptur eingearbeitet.

Patentansprüche

1. Elektrochemischer Sensor auf trockenchemischer Basis zur Bestimmung der Blutgerinnung, der auf einem inerten Träger mindestens 2 Elektroden aufweist, sowie ein trockenes Reagens, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Reagens ein Thrombinsubstrat enthält, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin abgespalten werden kann, und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist.
2. Elektrochemischer Sensor gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß er 2 Elektroden enthält, die aus dem gleichen Material, vorzugsweise Palladium, bestehen.
3. Elektrochemischer Sensor gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Thrombinsubstrat



ist, wobei

R1 einen Alkylrest oder Wasserstoff,

R2 einen Hydroxyalkylrest oder Wasserstoff und

R3 Wasserstoff, Halogen, Alkoxy oder Alkylthio bedeutet.

4. Elektrochemischer Sensor gemäß einem der Ansprüche 1–3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Reagens auch ein Glucose-oxidierendes Enzym, wie beispielsweise das Enzym Glucose-dye-oxidoreductase enthält.

5. Blutgerinnungsmeßsystem enthaltend einen elektrochemischen Sensor und ein Strommeßgerät, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Sensor ein solcher gemäß einem der Ansprüche 1–4 verwendet wird.

DE 100 16 775 A 1

6. Verfahren zur Bestimmung der Blutgerinnung mittels eines elektrochemischen Sensors, dadurch gekennzeichnet, daß an einen Sensor gemäß einem der Ansprüche 1–4 eine konstante Spannung angelegt, die zu untersuchende Blutprobe, so auf den Sensor aufgegeben wird, daß das Reagens und die Elektroden befeuchtet werden und der zwischen den Elektroden fließende Strom über die Zeit gemessen wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß damit die Prothrombinzeit (PT), die aktivierte partielle Prothrombinzeit (APPT) oder die "activated clotting time" (ACT) gemessen wird.

8. Reagens zur Bestimmung der Blutgerinnung enthaltend ein Thrombinsubstrat, das aus einem Peptidrest besteht, der von Thrombin abgespalten werden kann und über das Carboxylende amidisch an einen Phenylendiaminrest gebunden ist, dadurch gekennzeichnet, daß es auch eine Dye-Oxidoreductase, wie beispielsweise Glucose-Dye-Oxidoreductase enthält.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

